

Recherches immunologiques sur la péripneumonie

XIV. Description de deux techniques applicables sur le terrain pour le diagnostic de la maladie

par A. PROVOST (*)

(avec la collaboration technique de D. ALLOUM et N. GOMBOT)

RESUME

Ayant en vue la mise en place de moyens de diagnostic rapides et spécifiques pour la campagne interafricaine contre la péripneumonie, l'auteur propose et décrit en détail deux techniques applicables sans difficultés sur le terrain: l'une est la précipitation-diffusion en gélose adaptée en micro-technique, utilisant un gel d'agarose rehydratable et des disques de buvard imprégnés de réactifs puis desséchés; l'autre est une adaptation sur plaques de plexiglas à cupules de la réaction classique de Campbell et Turner, mettant en œuvre un matériel robuste adapté au transport tout-terrain, et des réactifs standardisés au laboratoire.

I. INTRODUCTION

Depuis quelques années, inspirée à la fois par les autorités politiques et vétérinaires, une action concertée se dessine sous l'égide de l'Organisation de l'Unité Africaine (O.U.A.) et, plus spécialement, sous celle d'une de ses sections techniques qu'est le Bureau Interafricain des Ressources Animales (I.B.A.R.), pour la mise en place d'une campagne interafricaine de lutte contre la péripneumonie (projet n° 28 de l'O.U.A./S.T.R.C.). Il n'y a pas lieu ici de retracer l'historique de cette action ni de lui trouver ses justifications qui sont amplement exposées ailleurs (25).

Les modalités d'intervention ont été définies en juillet 1970 à Lagos par une sous-commission du groupe d'experts FAO/OIE/OUA sur la péripneumonie bovine. Véritable bible d'action pratique (30), elle décrit pas à pas les

étapes de la campagne à venir. L'action proposée invite la pleine collaboration des éleveurs. Pour atteindre ce but, aucune méthode coercitive, tel l'abattage des malades et des contaminés, n'est proposée dans un premier temps; l'effort est reporté sur une vaccination généralisée et répétée pendant 3 ans, visant à abaisser l'incidence générale de la maladie. La méthode a fait ses preuves ailleurs, dont l'Australie (19) où la vaccination répétée et la surveillance de la commercialisation sont venues à bout de l'infection.

L'originalité du plan réside en la création d'unités de dépistage de la maladie qui, en un temps ultérieur, procéderont au contrôle des quelques foyers rémanents d'infection pour arriver, par l'élimination des porteurs chroniques, à l'éradication de la péripneumonie. Elles se verront confier en même temps le contrôle du bétail de commerce et, le cas échéant, des sondages sérologiques en région exposée à l'infection.

(*) I.E.M.V.T., Laboratoire de Recherches Vétérinaires de Farcha, B.P. n° 433, Fort-Lamy, Tchad.

La création de ces unités de dépistage devient dès lors l'une des pierres d'angle de l'action à venir et il convient dès maintenant de penser à leur création.

La centralisation des moyens de diagnostic dans les laboratoires bien équipés qui assureraient la surveillance d'un ou de plusieurs Etats ne peut être retenue pour des raisons pratiques : énormité des surfaces à couvrir, précarité des moyens de transport ou des systèmes de communication, mise en quarantaine des troupeaux sous test en attendant les résultats. Il paraît de beaucoup préférable que des unités mobiles puissent se rendre « au chevet » des troupeaux à examiner, ce qui est psychologiquement favorable pour entraîner l'adhésion des éleveurs.

On pourrait dès lors penser à la mise en place de camions laboratoires équipés d'un matériel sophistiqué : microscopes, étuves, centrifugeuses et bain-marie. L'expérience a montré que ces camions allaient à l'encontre du but envisagé. Fragiles, lourds, peu maniables, gros consommateurs de carburant, ils se sont révélés être un fiasco, en République Centrafricaine par exemple. Il est raisonnable de porter son choix sur des véhicules légers qui ont fait la preuve de leur robustesse et de leur maniabilité, que ce soit la classique Land-Rover à plateau arrière ou des camionnettes légères : Hanomag, Renault ou Mercedes. Le problème revient alors à celui de l'équipement en matériel scientifique de ces véhicules, ce qui suppose tout d'abord une définition précise des tâches qui seront confiées aux équipes de diagnostic.

Dans l'optique de la future campagne, on cherche à obtenir sur le terrain un diagnostic de certitude de l'infection péripneumonique sur des malades, des contaminés, des suspects. Deux éventualités se présentent :

- L'animal est vivant, auquel cas on peut :
 - soit chercher l'antigène péripneumonique dans un échantillon de lymphes obtenue par ponction pleurale ou mettre en évidence l'antigène circulant dans le sérum;
 - soit chercher les anticorps péripneumoniques sur un échantillon de sérum que l'on soumet à une réaction de fixation du complément.
- L'animal est mort, auquel cas on dispose

aisément des viscères et, partant, la recherche de l'antigène péripneumonique est aisée.

Au total, ce ne sont que deux réactions de laboratoire qui sont retenues : la réaction de fixation du complément et la précipitation. Cette dernière admet deux modalités d'exécution, soit la réaction interfaciale selon TURNER (34) soit la précipitation-diffusion en gel, appliquée par WHITE (35) et GRIFFIN (10). La réaction de TURNER a l'incomparable avantage de fournir une réponse spécifique en une demi-heure mais le double désavantage de devoir utiliser un matériel sous test rendu limpide après centrifugation voire défécation par l'acide acétique et d'être coûteuse en sérum précipitant. Pour des raisons de commodité pratique, c'est la réaction de précipitation en gel qui s'avère d'exécution la plus simple en brousse; la solution proposée plus loin ne nécessite qu'un matériel extrêmement simplifié.

La réaction de fixation du complément connaît des modalités d'exécution variables selon les techniques proposées. Parmi elles, la réaction de CAMPBELL et TURNER (4) a fait la preuve de sa spécificité et de sa sensibilité. Elle a été adaptée par HUDDART (11) à une utilisation en brousse. Pourtant, à l'examen, certaines des solutions retenues par HUDDART, telles la centrifugation des échantillons et leur inactivation au bain-marie, requièrent un matériel fragile.

Les modifications techniques qui sont ci-après proposées ont été conçues dans le souci de se débarrasser de tout matériel d'usage et d'entretien délicat. On a mis l'accent sur la simplification et la standardisation des opérations, sur la possibilité de rangement du matériel dans de simples caisses que l'on chargera sur le véhicule, bref sur la robustesse et la mobilité sans pour autant sacrifier la spécificité diagnostique des techniques préconisées.

II. MICRO-TECHNIQUE STANDARDISEE DE PRECIPITATION-DIFFUSION EN GELOSE

Après la publication princeps de WHITE (35), GRIFFIN (10) puis LINDLEY et PEDERSEN (17) ont appliqué avec succès la

réaction de précipitation-diffusion en gélose au diagnostic de la péripneumonie par mise en évidence des antigènes spécifiques dans les lésions. Une extrapolation est suggérée par le travail de BYGRAVE, MOULTON et SHIFRINE (3) qui couplent la recherche de l'antigène péripneumonique circulant chez les malades à une réaction de fixation du complément et arrivent ainsi à détecter près de 100 p. 100 des malades cliniques mais aussi des porteurs chroniques.

Vue sous ces deux angles, la méthode de précipitation-diffusion en gélose est extrêmement précieuse et mérite une large application. Elle fait malheureusement appel à une technologie relativement malaisée à mettre en œuvre hors du laboratoire, malgré l'essai de simplification qu'a tenté de lui apporter SHIFRINE (32) par l'emploi de plaques de gélose à sérum prédiffusé.

Il nous a paru utile dans un premier temps de reprendre pour la péripneumonie la solution que nous avons préconisée pour la peste

bovine, utilisant des disques de papier buvard imprégnés de réactifs desséchés et un gel de gélose tout préparé que l'on coulait sur place (27). Mais des progrès sensibles ont depuis lors été faits dans la préparation des gels, si bien que c'est une méthodologie entièrement nouvelle qui a été appliquée, tout en retenant le principe de la microtechnique utilisant des disques de papier buvard.

Le principe reste celui de la diffusion en gel d'un sérum connu (dans le cas présent, sérum antipéripneumonique) et d'un antigène inconnu (échantillon de lymphe, de broyat de poumon ou de sérum) avec apparition, le cas échéant, d'un immun-précipité dans la zone d'équivalence. Un antigène positif connu, introduit dans la réaction, sert de contrôle.

MATERIEL ET REACTIFS

Matériel et réactifs sont contenus dans une boîte de matière plastique à couvercle amovible, de dimensions $25 \times 18 \times 7$ cm (figure 1).



Fig. 1. — Matériel et réactifs pour la précipitation-diffusion en gélose (méthode des disques). La boîte contenant le matériel sert de chambre humide.

1. Gel d'agarose

On utilise des films tout préparés d'agarose réhydratable dans lesquels des cupules ont été creusées par le fabricant (*) (système

Seasep, n° REX 6457); le film est coulé sur une bande plastique transparente. Les cupules ont un diamètre de 5 mm et sont distantes les unes des autres de 4 mm. La conservation des films paraît être, sinon indéfinie, du moins très longue à température ambiante sans précautions spéciales.

(*) Marine Colloid, Inc., Biomedical Systems, Rockland, Maine 04841, U.S.A.

Les bandes sont orientées par inscription d'une flèche à l'encre de chine que l'on appose au dos de la bande plastique du côté ne portant pas le film d'agarose.

Réhydratation. Le fabricant préconise l'utilisation d'un bain d'eau distillée à 55-60° C. Un fluide à température ambiante (entre 20 et 40° C) nous a donné d'aussi bons résultats. On utilisera exclusivement pour réhydrater les bandes de l'eau merthiolatée à 1 p. 1.000 qui a l'avantage d'inhiber la croissance des contaminations bactériennes et fongiques : les bandes sont plongées dans ce liquide contenu dans des boîtes en matière plastique; elles y séjournent 45 minutes environ. On les en retire délicatement avec une pince anatomique en prenant garde de ne pas abîmer le gel d'agarose, dès lors réhydraté. La bande est plongée dans un autre récipient contenant du sérum physiologique merthiolaté à 1 p. 1.000; elle y séjourne pendant 30 minutes, temps pendant lequel se réalise l'équilibre ionique du gel, et est dès lors prête pour l'emploi. On doit prendre garde à ce qu'elle ne se dessèche pas.

2. Disques de réactifs secs

Le choix s'est porté sur des disques pour antibiogrammes non imprégnés d'antibiotiques, du type de ceux utilisés par GRASSET (9). On les achète tout découpés dans le commerce (*) et ils sont imprégnés à la demande, au laboratoire, de sérum précipitant ou d'antigène péripneumonique pour les disques de contrôle.

a) *Disques imprégnés de sérum précipitant.* — Le sérum est produit sur un mouton selon un processus classique d'hyperimmunisation (22). Ses qualités précipitantes sont contrôlées par précipitation-diffusion en gélose classique vis-à-vis d'échantillons de lymphé péripneumonique.

Les disques, livrés blancs, sont d'abord imprégnés d'une solution colorante rouge (azocarmin à 0,5 p. 100 dans le méthanol) puis desséchés à l'air libre sur un tamis de nylon. On distribue ensuite, à la pipette capillaire, le sérum sur les disques; ce procédé est préférable à celui qui consiste à les plonger dans un bain

du sérum car, imbibés, ils sont facilement détériorés par la pince en les ressortant. Le sérum se dessèche à l'air libre, les disques étant simplement posés sur un tamis de nylon.

On les conserve en tubes bouchés avec quelques grains de silicagel pour absorber l'humidité.

b) *Disques imprégnés d'antigène péripneumonique.* — On suit le même procédé, à cela près que les disques sont colorés en noir dans une solution de noir soudan à 0,1 p. 100 dans le méthanol. L'antigène est un ultrasonnat de *Mycoplasma mycoides*.

Les disques blancs, non imprégnés, serviront sur le terrain pour le diagnostic.

3. Chambre humide

La boîte servant au transport des réactifs sert de chambre humide : on y introduit quelques dizaines de ml d'eau puis un tapis de mousse de matière plastique sur lequel seront déposées les bandes; le couvercle doit être obligatoirement fermé pendant l'incubation.

4. Matériel suspect

Selon le cas, on dispose d'une lésion pulmonaire active ou de liquide pleurétique obtenu à l'autopsie ou, si le bovin est vivant et ne peut être (encore) abattu, de liquide pleurétique obtenu par ponction thoracique entre les 7^e et 8^e côtes ou de sérum sanguin obtenu par ponction jugulaire ainsi que cela sera décrit au chapitre sur la fixation du complément. Eviter les prélèvements trop chargés d'hémoglobine.

Dans le cas de séquestres, on procédera comme il est dit plus loin.

Au total, le matériel est donc très simple et peu volumineux :

- boîte de matière plastique,
- bandes d'agarose prédécoupée réhydratable,
- disques (rouges) de sérum précipitant,
- disques (noirs) d'antigène péripneumonique,
- disques (blancs) non imprégnés,
- sérum physiologique et eau merthiolatés,
- petits bacs ou boîte de Petri en matière plastique,

(*) B-D - Merieux, 69 Marcy-l'Etoile, France.

- pinces anatomiques, ciseaux,
- papier buvard,
- cahier, crayon à bille.

PROTOCOLE OPERATOIRE

- Réhydrater le nombre nécessaire de bandes d'agarose. Les essorer légèrement sur une feuille de papier buvard pour avoir une surface relativement sèche.
- Identifier des disques blancs non imprégnés par un numéro correspondant à celui du prélèvement.
- Plonger ces disques dans la lymphe ou le sérum suspects ou dans la lymphe exsudant du prélèvement de poumon.
- Avec une pince anatomique, déposer un disque rouge dans la cupule centrale d'une bande réhydratée; appuyer légèrement pour bien le faire pénétrer.
- Procéder de la même façon avec 3 disques imprégnés d'antigène positif en suivant la disposition de la figure 2. Rincer et essuyer la pince.
- Déposer dans les 3 cupules restées libres les disques imprégnés d'échantillon; il est parfois nécessaire de les essorer très légèrement pour enlever l'excès de fluide de façon à ne pas submerger les cupules où on les place.

Dans le cas de séquestres, il est préférable de déposer un peu de matériel nécrotique dans les cupules plutôt que d'essayer d'imprégner des disques.

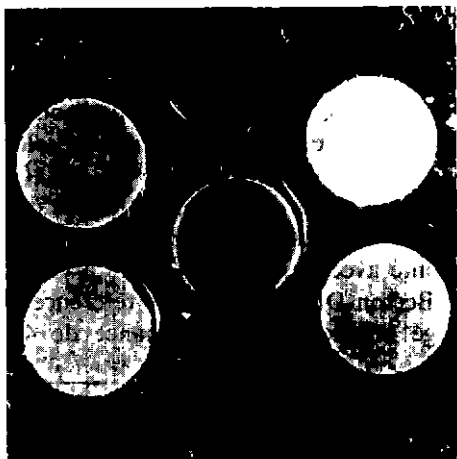


Fig. 3.1. — Deux échantillons sont positifs, un autre (disque blanc inférieur) négatif.

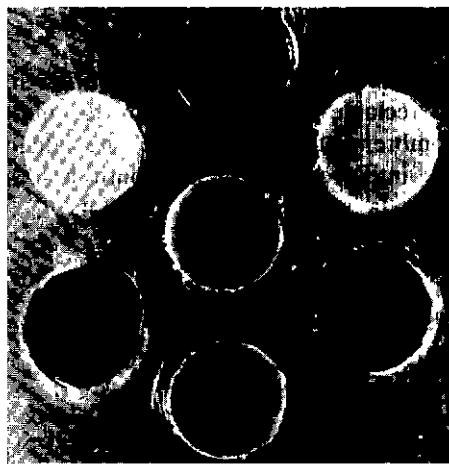


Fig. 2. — Disposition des disques dans les cupules du gel d'agarose : sérum au centre; disques noirs de contrôle; disques blancs imprégnés de liquides pathologiques.

- Porter les bandes dans la boîte humide. Refermer.
- Lire après 6 et 12 heures d'incubation à température ambiante. Pour ce faire, se placer dans une demi-obscurité et faire arriver le faisceau lumineux d'une lampe de poche sur la plaque sous une incidence de 45° C.

La réaction positive est caractérisée par une ligne de précipitation en face des disques blancs rejoignant et se confondant dans celles apparues en face des disques imprégnés d'antigène de contrôle.

En cas de réaction négative, seules apparaissent des lignes en face de ces derniers (figure 3).

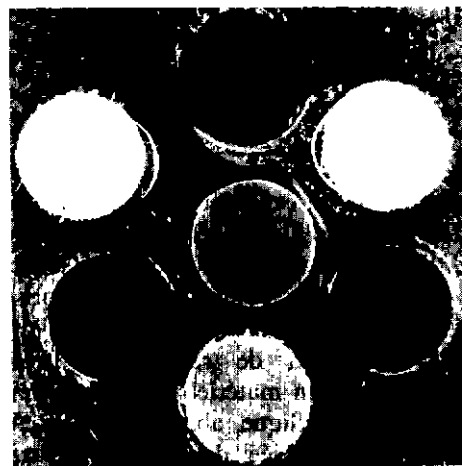


Fig. 3.2. — Quatre échantillons de sérums de bovins péripneumoniques sont positifs (antigène circulant). On remarquera que la ligne de précipitation de cette galactane circulante est plus nette que celle de l'antigène de référence.

CRITIQUE

La technique proposée est d'exécution simple et ne réclame qu'un minimum de matériel, d'encombrement réduit. Elle ne demande aucune interprétation mais aboutit à la positivité ou la négativité d'un résultat.

Mise à l'épreuve sur une trentaine d'échantillons, elle a conduit à une parfaite concordance avec la précipitation interfaciale de TURNER.

La limite de sa spécificité paraît être celle que suggèrent LINDLEY et PEDERSEN (17, 18) : des animaux récemment vaccinés contre la péripneumonie peuvent fournir des réactions positives par suite de la présence d'antigène péripneumonique dans différents tissus, dont le poumon et les ganglions lymphatiques pulmonaires. C'est une éventualité que nous n'avons pas explorée pour la souche T₁ qui sera quasi uniquement employée en Afrique Centrale dans la campagne à venir (25). Dans un premier temps, il paraît sage de réserver le test à la confirmation des cas cliniques ou nécropsiques de péripneumonie.

Il peut arriver qu'une ligne se développe entre les disques de prélèvement et ceux d'antigène positif. Cette réaction est spécifique, mettant en évidence un anticorps présent dans le prélèvement en même temps que l'antigène.

III. ADAPATATION SUR PLAQUES DE LA REACTION DE CAMPBELL ET TURNER

La réaction de fixation du complément ci-dessous proposée n'est qu'une adaptation, d'exécution simplifiée, de la réaction classique de CAMPBELL et TURNER (4). L'amélioration porte sur des points de détail : prise de sang, identification des animaux, dilution des sérums, utilisation de réactifs prétitrés au laboratoire et d'un matériel robuste en matière plastique ou métallique, absence de bain-marie, codification simplifiée de chacun des temps d'exécution permettant sa mise en œuvre par des opérateurs de formation technique modeste, interprétation ne donnant pas lieu à contestations.

La méthodologie de la réaction sera tout d'abord décrite en détail, puis ses avantages et ses inconvénients discutés.

MATERIEL

1. Matériel de saignée

Au gré de l'utilisateur, on choisira :

— Le tube à saignée « Venex » de l'I.S.T. (*) en polyéthylène souple, monté d'une aiguille amovible à ponction jugulaire. Les tubes sont prénumérotés (bande de sparadrap portant un numéro au stylo à bille), dans la série de numéros du choix de l'opérateur, et placés avant l'opération de saignée en ordre déterminé sur un portoir de bois répertorié par une lettre majuscule; chaque portoir est percé de 39 trous pour le logement des tubes, en 4 rangées de 8 et une de 7 (figure 4). La saignée s'effectue à la veine jugulaire; elle nécessite la contention de l'animal en décubitus latéral. Aussitôt la prise de sang effectuée, le bovin est identifié comme il sera dit plus loin et le tube Venex placé en position verticale sur le portoir de bois. La coagulation et la rétraction du caillot interviennent dans l'heure suivante et fournissent les quelques microcubes de sérum nécessaires à la réaction.

Les avantages du tube Venex sont la résistance et la possibilité de sa réutilisation après lavage, ce qui en fait un matériel de saignée à bon marché, particulièrement robuste. Le désavantage est la nécessité de la contention.

— Le « Phlebo-Pung » de Identi-X-Hauptner (**) (figure 5), utilisant des aiguilles fixes 20/10, des aiguilles 15/10 amovibles à embout américain ou des aiguilles 20 G, 1 1/2 Becton-Dickinson (***) à double pointe (référence 574 601), en principe prévues pour usage unique mais qu'on peut utiliser, selon la technicité de l'opérateur, de 6 à 10 fois consécutives après avoir chassé le peu de sang qui y reste en soufflant dedans. Le Phlebo-pung est monté avec des tubes siliconés à vide préalable Becton-Dickinson (***), référence 3274, à usage unique, d'une contenance de 4 cm³;

(*) Institut de Sérothérapie de Toulouse, 22, rue Ingres, 31 Toulouse, France.

(**) Identi - X - Hauptner, 67 Ernosolsheim-les-Saverne, France.

(***) Becton-Dickinson France, Cedex 227, 38 Grenoble-gare.

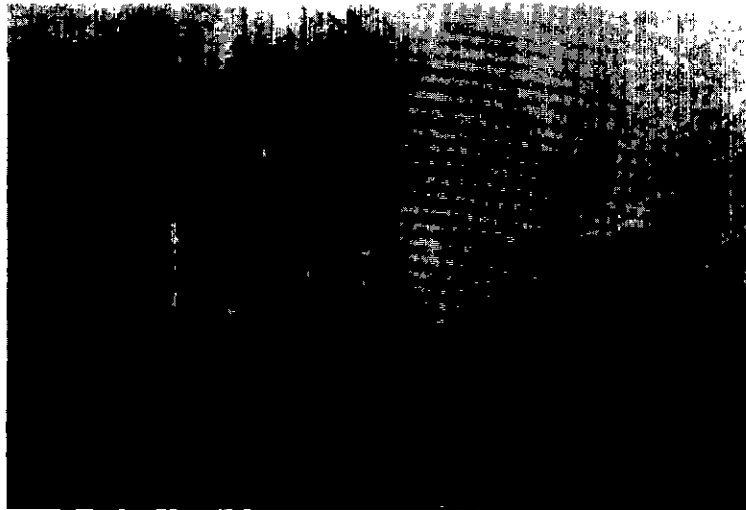


Fig. 4. — Portoirs de bois utilisés pour le rangement des tubes à saignée : portoir A pour les tubes Venex, portoir G pour les tubes Becton-Dickinson.

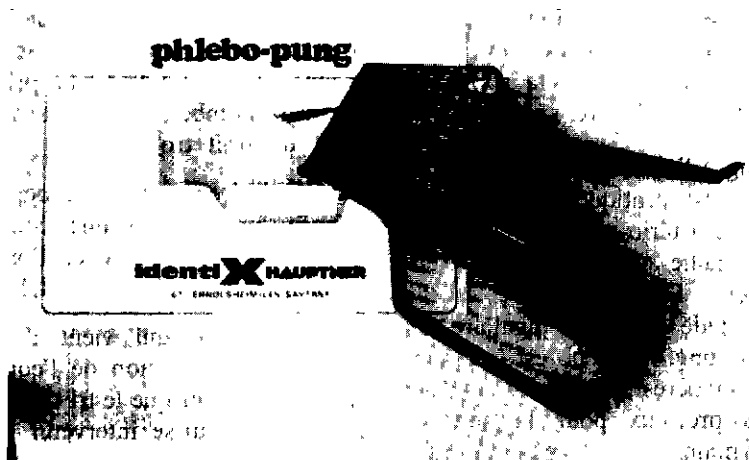


Fig. 5. — « Phlébo-pung » monté d'une aiguille 20 G 1 1/2 avec son capuchon de protection et d'un tube à saignée Becton-Dickinson.

on applique à l'avance une bande de sparadrap sur les tubes, bande sur laquelle, au moment de la saignée, on reportera le numéro d'identification de l'animal.

Le manuel opératoire est parfaitement décrit dans le dépliant du fabricant. D'après notre expérience, il paraît de beaucoup préférable de se servir d'aiguilles 20 G Becton-Dickinson : très fines (1 mm) et souples, elles permettent de réaliser une ponction jugulaire pratiquement indolore, à tel point que certains bovins ne la remarquent pas; l'animal est contenu par 2 aides, l'un qui maintient la tête réclinée sur le côté, pour faire saillir la veine, l'autre passant

la queue devant le jarret du côté de l'opérateur (figure 6).

Ainsi réalisée, l'opération ne demande que quelques secondes et le rythme de prise de sang est extrêmement rapide : un seul technicien réalise de 100 à 120 saignées à l'heure pourvu que la contention soit bien organisée. Le désavantage tient au prix des tubes à vide préalable qui ne peuvent être utilisés qu'une seule fois.

Aussitôt la prise de sang faite, les tubes sont placés en position verticale dans l'ordre croissant des numéros sur un portoir de bois



Fig. 6. — Prise de sang à la veine jugulaire avec l'appareil Phlébo-pung; la contention debout est assurée par deux aides.

analogue à celui illustré dans la figure 4, mais à logements plus étroits pour que les tubes ne jouent pas. La coagulation et la rétraction du caillot se font dans l'heure suivante.

La prise de sang à l'artère coccygienne inférieure telle qu'elle est pratiquée en Australie par incision du bloc artério-veineux (8, 33) ou sa ponction à l'aiguille (1, 20) n'a pas rencontré notre faveur. En effet, outre qu'elle n'est pas plus rapide qu'à la jugulaire en utilisant le Phlébo-pung, la queue est fréquemment souillée de matières fécales, ce qui fait perdre un temps précieux pour la nettoyer puis se laver les mains.

2. Identification des animaux

L'apposition de boucles auriculaires numérotées a été totalement éliminée; en effet, pour le cas où l'on trouverait des animaux positifs à la lecture de la réaction, il serait nécessaire de reprendre l'ensemble du troupeau sous test pour retrouver le numéro de l'animal suspect. Il paraît de beaucoup préférable de dessiner un grand numéro sur la croupe de l'animal (endroit où il a le moins de chance de se frotter à d'autres) avec une peinture à séchage ultra-rapide et résistante à la pluie si le tri n'intervient qu'en un temps ultérieur. Les peintures vinyliques pour carrosserie automobile donnent toute satisfaction. C'est la solution qu'a adoptée HUDDART (11). Toutefois, plutôt qu'un pot et un pinceau, il est avantageux, propre et

rapide de recourir aux bombes de peinture sous pression: on dessine le numéro sur la croupe au moment de la prise de sang, en tenant la bombe à 2 cm des poils pour ne pas avoir un trait trop large.

Selon la fréquence des robes dans une région donnée, on choisira une couleur adaptée et bien visible. Le bleu et l'orangé paraissent particulièrement recommandables.

Le troupeau qui vient d'être saigné doit rester à la disposition de l'équipe de contrôle sérologique pour que le tri des animaux positifs, s'il y en a, puisse intervenir rapidement.

3. Matériel de campement

Ce sera du matériel de camping banal: 2 tables pliantes robustes à plateau de 1,20 m \times 1 m, 2 chaises pliantes, 1 bec Mecker alimenté par une bouteille de butane, allume-gaz.

— Réfrigérateur à gaz butane pour la conservation des réactifs thermofragiles. Il n'est mis en route qu'au campement.

— Caisse isotherme à compartiments métalliques (grillage) ou en matière plastique pour le transport des mêmes réactifs; les flacons de réactifs reposent sur une barre de glace dans les compartiments prévus.

— Bâche ou toile de tente avec des piquets pour travailler à l'ombre s'il n'y a pas d'arbres.

TEST DE FIXATION DU COMPLEMENT POUR LA PERIPNEUMONIE

DATE :

LIEU : CANTON :

S/PREFECTURE : PREFECTURE : ETAT :

PROPRIETAIRE : EQUIPE OPERATEUR

Imp. du Tchad 71 - 439

PLAQUE :

N^o5

à

1	2	3	4	5
6	7	8	9	10
11	12	13	14	15
16	17	18	19	20
21	22	23	24	25
26	27	28	29	30
31	32	33	34	35
36	37	38	39	40
41	42	43	44	45
46	47	48	49	50
51	52	53	54	55
56	57	58	59	60
61	62	63	64	65
66	67	68	69	70
71	72	73	74	75
76	77	78	79	80
81	82	83	84	85
86	87	88	89	90
91	92	93	94	95
96	97	98	99	100

— Caisses « ad-hoc » pour rangement du matériel.

— Véhicule tout terrain (type Land-Rover) équipé d'un réservoir supplémentaire de carburant et d'une batterie supplémentaire d'accumulateurs 12 volts 90 ampères-heure alimentée par un alternateur.

— Filtres à bougie et colonne à déminéraliser portative, à cartouches amovibles de résines (*).

— Bacs de lavage, en matière plastique souple. Torchons, savon, éponge, détergent liquide de laboratoire (7 X, par exemple).

4. Matériel scientifique

— Plaques de plexiglas (perspex) à 80 cupules, dites à hémagglutination du type O.M.S. (**). Chaque plaque est répertoriée sur l'un des grands côtés avec une lettre majuscule; par convention, ce côté est tourné vers l'opérateur.

Dans l'exécution du test, la lettre de la plaque correspond à celle d'un des portoirs de bois; ce repérage permet de les identifier et de les orienter dans la suite des opérations.

— Cartons de bristol blancs, imprimés d'un quadrillage du modèle ci-joint dont les cotes sont calculées pour les plaques O.M.S. (figure 7). On inscrit dans les petites cases le numéro de sérum.

Sous chaque plaque, on glisse un bristol sur lequel on reporte la lettre d'identification de la plaque.

L'ensemble bristol-plaque permet de disposer de 40 doubles cupules, couplées 2 par 2, répertoriées par un même numéro. Trente-neuf d'entre elles correspondent à un sérum sous test : cupule de gauche pour la réaction, cupule de droite pour l'activité anticomplémentaire éventuelle du sérum. Les 2 cupules restant en bas à droite serviront de contrôle de l'activité du complément (figure 7).

— Quatre jeux de 2 anses à dilution de TAKATSY (***) (micro-diluteurs), de 25 micro-litres.

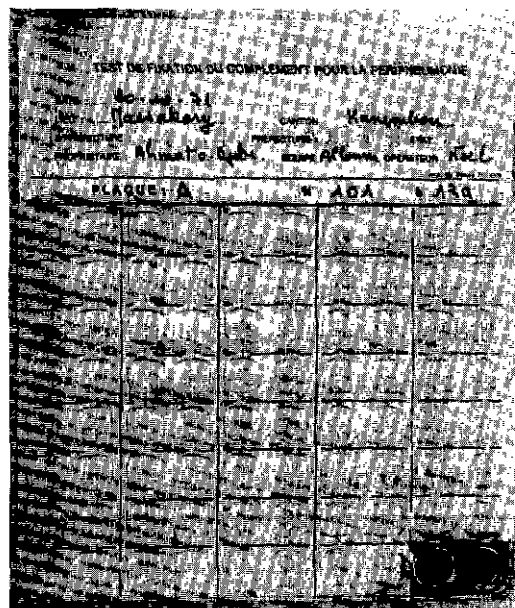


Fig. 7. — Plaque à cupules types O.M.S. posée sur un bristol de travail.

On disposera également de feuilles de papier buvard (« Go-no-go » diluter delivery tester) vendues par le fabricant, destinées à contrôler l'exacte quantité de liquide délivrée par les anses après qu'elles aient été régénérées dans la flamme. Cette opération de contrôle peut n'intervenir qu'une fois par jour ou en cas de doute.

Sur la table de travail, les anses sont tenues verticales sur un portoir.

— Rhéomètres de 1 ml à répartition automatique Becton-Dickinson, réglés très précisément pour délivrer 0,25 ml de liquide : le contrôle du réglage s'effectue en donnant 100 coups de piston qui doivent très exactement fournir 25 ml. On disposera de 4 rhéomètres, un par réactif, identifiés d'une lettre ou d'un numéro pour ne pas les mélanger.

— Plaque chauffante électrique (*) à plateau de dimensions utiles 55 × 30 cm (figure 8). L'alimentation se fait en courant continu grâce à la batterie supplémentaire du véhicule. La température est réglée à 37° C par thermostat à contact plongeant dans le bain de sable de la plaque. Les dimensions du plateau permettent de loger 6 plaques O.M.S., donc d'examiner 234 sérums. Une plaque de plexiglas ou d'aluminium, de mêmes dimensions que le

(*) Paris-Labo, 7, rue du Cardinal-Lemoine, 75 Paris 5^e.

(**) Méca-Vigor, 88, rue de la Folie-Méricourt, 75 Paris 11^e.

(***) Poly-Labo, 305, route de Colmar, 88 Strasbourg - Meinau, France.

(*) Etablissements A. G. Haas et Cie, 11, rue Honoré, 93 Pantin, France.

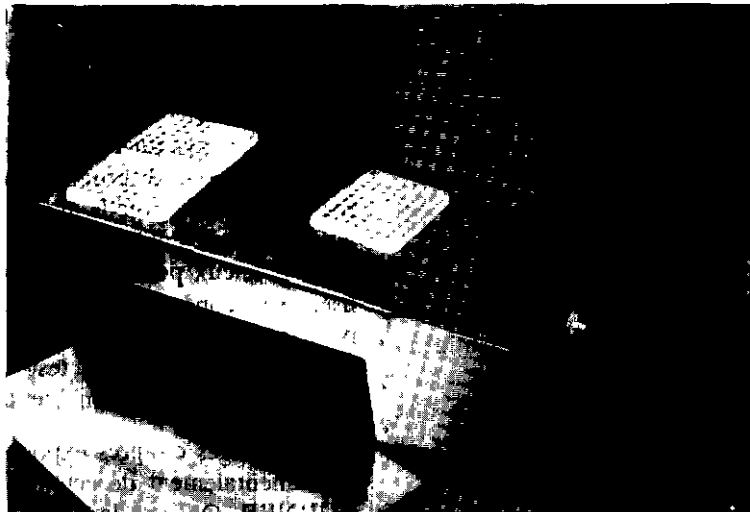


Fig. 8. — Plaque chauffante; remarquer le couvercle de protection posé à ses pieds.
Trois plaques O.M.S. reposent sur le plateau de chauffage.

plateau, se pose sur les plaques O.M.S. pour éviter l'évaporation des réactifs dans les cupules.

— Réveil-minuterie de laboratoire.

— Jeu de béchers et éprouvettes en matière plastique (*). Pots de 50, 100 et 1.000 cm³, en matière plastique souple, à fermeture étanche. Quelques pipettes de 1,2 et 5 ml et tubes verre incassable (Corex) (*).

— pH-mètre de poche à pile (**), transistorisé ou, à défaut, papier pH sensible dans la gamme de la neutralité.

— Thermomètre gradué de 0 à 100° C.

— Petite centrifugeuse électrique se branchant sur la batterie du véhicule (***) ou centrifugeuse à main (*). On ne l'utilise que pour les rares tubes de sang dans lesquels le caillot a mal exsudé.

— Cahier servant à consigner les paramètres des réactions et les résultats.

5. Réactifs

— Sachets d'ingrédients prépesés au laboratoire, en sacs de polyéthylène thermoscellés, permettant par simple dilution en eau distillée

bouillante de préparer sur place le tampon véronal-véronal sodique de MAYER et LEVINE. Il existe dans le commerce des pastilles à même usage (*).

On obtient de la sorte un tampon concentré qui est dilué au 1/5 en eau distillée ou déionisée avant l'utilisation; on vérifiera le pH qui, à la demande, sera amené à pH 7,2 avec une solution N/10 de soude ou d'acide chlorhydrique contenue dans des flacons compte-gouttes.

Ce tampon sert à effectuer toutes les dilutions, sauf celles du sérum. Une petite quantité, conservée sous froid, sera utilisée pour la dilution extemporanée du complément.

— Tampon de MAYER et LEVINE phéniqué à 0,25 p. 100, conservé à température ambiante. *Le tampon phéniqué sert exclusivement à la dilution extemporanée des sérums sous test* (et, accessoirement, au prétramage du complément au laboratoire). Il est réparti dans les cupules avec un rhéomètre qui lui est exclusivement réservé.

L'addition de l'acide phénique a pour but de détruire le complément natif des sérums sous test, mettant ainsi en application les observations de PRIESTLEY (24) et d'ETHERIDGE et LLOYD (7) et, par-là, permettant de se passer de leur complémentation au bain-marie

(*) Prolabo, 20, rue Pelée, 75 Paris 11^e.

(**) Ph-meter 29-Radiometer, Emdrupvej 72, Copenhagen NV, Danemark.

(***) Modèle LFC/1276, Luckham Ltd, Labro works, Victoria gardens, Burgers hill Sussex, Angleterre.

(*) CF buffer tablets Wellcome Ltd ou CFT diluent tablets Oxoid (code BR 16), Oxoid Ltd, Southwark bridge road, London SE 1.

à 56° C, dès lors inutile. On verra plus loin qu'un procédé de titrage du complément, en présence de la même quantité de phénol que celle qui existera dans la réaction finale, permet de tenir compte de son inactivation limitée (0,33 U.H.₅₀).

— Réactifs habituels de la réaction de CAMPBELL et TURNER :

- Antigène bouilli, prététré au laboratoire; on utilise habituellement la dilution au 1/40 en tampon, fournissant 5 Unités Antigéniques (U.A.) par 0,25 ml.

- Complément lyophilisé (*), dont le titre est déterminé au laboratoire. Il est dilué au moment de l'emploi en tampon réfrigéré, après avoir été réhydraté selon les indications du fabricant.

- Sérum hémolytique anti-hématies de mouton (*) à diluer extemporanément en tampon à la dilution établie par titrage préalable au laboratoire; on utilise dans le test 6 Unités Hémolytiques 50 p. 100 (U.H.₅₀).

- Hématies de mouton, en suspension toute prête à 6 p. 100 standardisée au laboratoire selon les indications de TEAKLE (33) (*vide infra*). Le liquide de suspension est la solution D.G.V. de CLARKE et CASALS (5), à laquelle on ajoute 1 p. 1.000 d'acide de sodium selon les indications de DUBOIS (6). Dans ce fluide, les hématies se conservent pendant plusieurs semaines. Pour éviter les chocs des bulles d'air dus aux chocs des pistes, on utilise pour le transport de la suspension des flacons en matière plastique souple de 100 cm³, à bouchage hermétique, qui permettent par compression de leur corps d'araser le niveau du liquide au bord du goulot.

- Sérum bovin antipéripneumonique positif, lyophilisé; il sert de témoin positif dans la réaction.

Le système hémolytique est obtenu extemporanément par mélanges à parties égales, en quantité requise (130 ml environ pour 234 sérums à examiner), d'hématies à 6 p. 100 et d'hémolyse à 12 U.H.₅₀.

Tous les réactifs sont conservés pendant le transport en caisses isothermes et, si l'on en dispose, dans le réfrigérateur à gaz lorsque le camp est établi.

(*) B-D Mérieux, 69 Marcy-l'Etoile, France, ou Wellcome Research Laboratories, Beckenham, Kent, Angleterre (référence VD 10-12).

PROTOCOLES OPERATOIRES

A. Titrage préalable des réactifs au laboratoire

L'un des avantages de la méthode est que les opérateurs disposent sur le terrain de réactifs prététrés qu'ils n'ont plus qu'à diluer au moment de l'utilisation. Cela est particulièrement précieux pour le complément qui, lyophilisé, se conserve parfaitement sous froid pendant plusieurs semaines; un témoin introduit lors de l'exécution du test indiquera que la quantité requise a bien été amenée.

Les titrages ci-après exposés ne diffèrent pas fondamentalement de ceux de CAMPBELL et TURNER. On peut les effectuer en tubes (avec la nécessité d'un bain-marie à 37° C) ou sur plaque.

1. Préparation de la suspension d'hématies standardisée à 6 p. 100

Récolter comme à l'accoutumée le sang de mouton par ponction jugulaire stérile, soit sur billes de verre, soit en solution d'ALSEVER (2) de formule connue; dans ce dernier cas, ne pas utiliser les hématies avant 48 heures. Filtrer la suspension sur gaze, centrifuger à vitesse moyenne (3.000 tours, 20 minutes) et laver à 4 reprises en tampon le culot d'hématies.

Dans une éprouvette, préparer une suspension d'hématies en solution D.G.V. -acide de sodium, ajustée le plus près possible, à 6 p. 100. La quantité d'hématies en suspension représente, par convention d'approche, une quantité de 20 g d'hémoglobuline par litre. A l'aide d'une pipette de SAHLI, on prélève 20 µl de suspension que l'on porte dans 5 ml d'eau distillée ammoniacquée à 0,05 p. 100; on laisse l'hémolyse se parfaire pendant 10 minutes. La quantité d'hémoglobine présente est estimée au colorimètre en utilisant une longueur d'onde de 545 nm, par rapport à une solution aqueuse connue d'hémoglobine. La concentration de la suspension d'hématies est alors ajustée à la demande.

Le diluant utilisé pour préparer la suspension d'hématies est la solution D.G.V. de CLARKE et CASALS, modifiée par adjonction d'acide de sodium, agent conservateur (9) :

Véronal	0,58 g
Gélatine	0,60 g
Véronal sodique	0,38 g

CaCl ₂ anhydre	0,02 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,12 g
NaCl	8,5 g
Glucose	10,0 g
NaN ₃	1,0 g
Eau distillée Q.S.	1 l

Dissoudre à chaud le véronal et la gélatine dans 250 ml d'eau; ajouter les autres ingrédients en complétant le volume à 1 litre dans une fiole jaugée; stériliser à 110° C (0,5 bar) pendant 10 minutes. Le pH doit se situer entre 7 et 7,6.

La suspension d'hématies standardisée est répartie en flacons plastiques de 100 cm³. Le

numéro du lot est inscrit de façon indélébile (sparadrap et crayon à bille).

2. Détermination de l'Unité Hémolytique 50 p. 100 de sérum hémolytique (U.H.₅₀)

Cette opération est à réaliser avant la détermination du titre exact du complément; on l'exécute en présence d'un léger excès de complément (dilué au 1/40 ou au 1/20) :

— diluer le sérum hémolytique au 1/250, 1/500, 1/1.000 ... 1/5.000 en tampon de MAYER et LEVINE;

— répartir chaque dilution de sérum hémolytique dans une série de tubes suspendus sur un portoir, selon le schéma du tableau I.

TABEAU N° I

Titrage du sérum hémolytique

Sérum hémolytique	Dilution	1/250	1/500	1/1000	1/1500	1/5000
	Quantité	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Hématies à 6 p.100		0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
	 30 minutes température ambiante.....				
Complément 1/10 ou 1/20		0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Tampon		0,50	0,50	0,50	0,50	0,625
	 30 minutes 37° C				
		puis centrifugation				

On recherche le tube dans lequel existe l'hémolyse 50 p. 100. Pour ce faire, si l'on n'a pas l'habitude d'apprécier l'hémolyse, on peut s'aider d'une gamme ainsi constituée :

- Mélanger à parties égales 5 ml de la suspension d'hématies à 6 p. 100 et 5 ml d'eau distillée ou de carbonate de sodium à 1 p. 100; on obtient ainsi une hémolyse à 100 p. 100 d'hématies à 3 p. 100.

- Préparer 3 tubes :

- tube 1 : 1 ml hématies lysées + 3 ml tampon;
- tube 2 : 2 ml hématies lysées + 2 ml tampon;
- tube 3 : 3 ml hématies lysées + 1 ml tampon.

- Préparer dans 4 tubes à hémolyse les mélanges :

- 0,25 ml du tube 1 + 0,75 ml tampon, fournissant l'hémolyse à 25 p. 100;

- 0,25 ml du tube 2 + 0,75 ml tampon, fournissant l'hémolyse à 50 p. 100;

- 0,25 ml du tube 3 + 0,75 ml tampon, fournissant l'hémolyse à 75 p. 100;

- 0,25 ml d'hématies lysées + 0,75 ml tampon, fournissant l'hémolyse à 100 p. 100.

Les couleurs des surnageants de centrifugation des tubes du titrage sont comparées à celles de la gamme d'hémolyse ainsi préparée; on retient le tube du titrage dont la couleur se rapproche le plus de celle de l'hémolyse à 50 p. 100; il contient 1 U.H.₅₀. Le tube témoin sans sérum hémolytique ne devra présenter aucune hémolyse, preuve de l'absence de pouvoir hémolytique du complément et de la résistance des hématies utilisées.

Dans la réaction, on utilise 6 U.H.₅₀. Le système hémolytique est donc préparé extemporanément en mélangeant 1 partie de sérum hémolytique dilué pour contenir 12 U.H.₅₀ et 1 partie d'hématies à 6 p. 100; on laisse le

mélange pendant 30 minutes à température ambiante avant de l'utiliser.

La dilution d'utilisation du sérum hémolytique est inscrite sur le flacon.

3. Titrage du complément lyophilisé

Ce titrage doit être obligatoirement effectué :

- pour tout nouveau lot de complément; on y procède alors en présence de l'antigène pour apprécier son éventuel pouvoir anti-complémentaire;

— pour chaque dilution de l'antigène lorsque l'on procède au titrage de ce dernier.

Le complément est réhydraté selon les indications du fabricant (ce qui est particulièrement important pour le complément de Wellcome). Ensuite, toutes les dilutions étant faites en fluides refroidis :

- diluer le complément du 1/10 au 1/100 puis répartir les dilutions dans une série de tubes à hémolyse sous le volume de 0,25 ml, comme indiqué au tableau II;

TABLEAU N°II

Titration du complément

	Dilution	1/10	1/20	1/100
Complément	Quantité	0,25	0,25		0,25
Antigène à 1/m		0,25	0,25		0,25
Tampon phéniqué		0,25	0,25		0,50
		30 minutes 37° C	
Système hémolytique		0,25	0,25		0,25
		30 minutes 37° C	

- ajouter à chaque tube 0,25 ml d'antigène à dilution préconisée pour la réaction (généralement 1/40) ou, dans le cas d'un titrage d'antigène, aux dilutions 1/m, 1/n, 1/p ...; il y a alors autant d'opérations de titrage du complément que de dilutions d'antigène à essayer;
- ajouter les autres réactifs comme indiqué : le tampon est du tampon *phéniqué* pour tenir compte du fait que, dans la réaction finale, le complément sera en présence de la même quantité d'acide phénique introduit pour inactiver le complément natif des sérums sous test.

On apprécie la dose minimale hémolytique (DMH) dans le tube où existe 100 p. 100 de lyse; on peut, là encore, s'aider d'une gamme d'hémolyse. Le tube témoin ne doit pas présenter de lyse.

Dans la réaction, on utilise 2,5 DMH, c'est-à-dire l'on divisera par 2,5 la dilution du complément donnant 100 p. 100 de lyse pour

obtenir la dilution à utiliser dans la réaction. On ne doit pas utiliser les compléments dont les dilutions d'utilisation tombent au-dessous du 1/30.

Si l'équipe sérologique part avec plusieurs lots de complément, la dilution d'utilisation de chacun d'eux devra être connue et consignée dans le cahier d'essais.

4. Titration de l'antigène

Etant donné la bonne stabilité de l'antigène, ce titrage n'est à effectuer au laboratoire que lorsqu'on met en circulation un nouveau lot.

Le titrage est réalisé « en échiquier », chaque dilution d'antigène étant titrée par rapport aux mêmes dilutions d'un même sérum positif connu. Pour chacune des dilutions d'antigène, on introduit la quantité de complément déterminée précédemment :

- diluer le sérum positif de 1/5 à 1/2.560;
- préparer les dilutions d'antigène en tampon 1/10, 1/20 ... 1/120.

TABLEAU N°III
Titration de l'antigène

	Dilution	1/5	1/10	1/2560
Sérum de référence	Quantité	0,25	0,25		0,25
Tampon					0,25
Antigène 1/x		0,25	0,25		0,25
Complément à 2,5 DMH		0,25	0,25		0,25
	 30 minutes 37° C			
Système hémolytique		0,25	0,25		0,25
	 30 minutes 37° C			

La réaction sera disposée comme indiqué au tableau III.

Il y a autant de portoirs que de dilutions d'antigène.

On recherche la plus haute dilution de l'antigène donnant le maximum de fixation avec la plus haute dilution de sérum. Elle contient 1 Unité Antigénique (U.A.). Dans la réaction, on utilise 5 U.A., soit une dilution de l'antigène 5 fois moins élevée. On devra alors se servir de la dilution de complément correspondant à la dilution de l'antigène et déterminée au temps précédent.

L'antigène non dilué est conditionné en flacons de plastique souple sur lequel on marque de manière indélébile sa dilution d'utilisation.

B. Exécution de la réaction

1. Temps préliminaire après la prise de sang

L'opérateur, secondé par un aide non spécialisé, dispose sur l'une des deux tables (figure 9) :

- La plaque chauffante électrique, reliée par un prolongateur aux cosses de la batterie supplémentaire du véhicule; ajuster le thermostat à 37° C;

- Les portoirs contenant les tubes à saignée, débarrassés de leur bouchon de fermeture par l'aide; l'opération doit s'effectuer sans heurts pour ne pas remettre d'hématies en suspension. L'exsudation du caillot fournit les quelques microlitres de sérum nécessaires. Les très rares tubes où il n'y aurait aucune exsudation sont immédiatement centrifugés; c'est une éventualité exceptionnelle;



Fig. 9. — Ensemble du matériel pour la réaction de fixation du complément sur plaques.

- La réserve de tampon, qu'il aura auparavant préparée;
- La réserve d'eau déionisée;
- Le réveil.

Sur l'autre table :

- Les réactifs dont il a immédiatement besoin (tampon phéniqué; antigène, à la dilution requise);
- Les anses de Takatsy sur un portoir stable;
- Deux béciers d'eau déionisée;
- Une feuille de buvard ou une feuille « go-no-go »;
- Un tube Mecker alimenté en butane;
- 6 plaques O.M.S., répertoriées par une lettre, posées chacune sur l'un des bostols

quadrillés sur lequel est porté la lettre de la plaque correspondante (figure 7);

- 5 rhéomètres automatiques pour chacun des réactifs, préalablement contrôlés quant à l'exactitude de la quantité de liquide délivré.

2. Protocole

a) Dilution des sérums. — Délivrer au rhéomètre automatique 0,25 ml de tampon phéniqué dans tous les trous des plaques.

A l'aide de 2 anses de Takatsy, prélever dans le premier tube à saignée, en surface, deux fois 25 μ l de sérum. Ils sont immédiatement reportés et dilués dans les deux cupules correspondantes de la plaque O.M.S., les anses étant tenues comme des baguettes chinoises et tournées entre le pouce et l'index (figure 10).



Fig. 10. — Dilution des sérums. Les anses de Takatsy sont tenues comme des baguettes chinoises.

On obtient ainsi directement dans les cupules une dilution au 1/11 (*) de sérum dont le complément natif est inactivé par le phénol.

Plonger les boucles des 2 anses qui viennent d'être utilisées dans un bécier d'eau déionisée. L'aide les saisit, les flambe au rouge sombre dans la flamme, les refroidit en les plongeant dans un autre bécier d'eau déionisée et les essore sur le buvard ou les contrôle sur le

papier « go-no-go », puis les replace sur le portoir.

Pendant ce temps, le technicien dilue un autre sérum avec une autre paire d'anses. En synchronisant leurs mouvements, aide et opérateur disposent toujours de 2 paires d'anses sèches et froides.

Le rythme de dilution est rapide, demandant de 5 à 7 minutes seulement pour traiter les 39 sérums d'un portoir.

Six plaques (unité de travail) sont préparées. Les sérums sont conservés jusqu'à la fin des opérations pour contrôler ceux pour lesquels existerait un doute.

(*) Pour poursuivre l'analogie avec la réaction de CAMPBELL et TURNER, on considère qu'il s'agit d'une dilution au 1/10; cette manière de faire n'a aucune influence sur les résultats.

Pour les animaux cliniquement malades, on pourra effectuer sur le sérum la recherche de l'antigène circulant par précipitation-diffusion en gélose comme cela a été décrit plus haut.

b) Introduction des réactifs — Avec les rhéomètres automatiques, distribuer par colonne : 0,25 ml d'antigène dilué dans les cupules-réaction (colonnes de gauche), ainsi que dans la dernière cupule en bas à droite de chaque plaque (cupule témoin du complément); 0,25 ml de tampon dans les cupules-témoins des sérums (colonne de droite), de même que dans la cupule-témoin du complément; 0,25 ml de complément dilué extemporanément en tampon glacé à la dilution requise. Pour soutenir le rythme de travail et éviter les erreurs, il y a intérêt à ce que le chef d'équipe prépare le complément pendant les opérations antérieures.

Remarque. L'une des cupules-témoin du complément peut être remplacée par un témoin réalisé avec le sérum bovin positif de référence qui subira le même traitement (dilution en tampon phéniqué) que les sérums sous test.

c) Incubation. — Les plaques préparées sont placées sur le plateau chauffant préréglé à 37° C et couvertes d'une plaque pour éviter l'évaporation.

On incube pendant 30 minutes, qui sont mises à profit pour préparer le système hémolytique, rincer les rhéomètres à l'eau déionisée et reporter les numéros des sérums dans le cadre prévu sur les bistrots.

d) Répartition du système hémolytique. — Répartir au rhéomètre 0,25 ml dans toutes les cupules.

Couvrir les plaques et réincuber pendant 30 minutes.

Au total, pour chaque sérum sous test, l'exécution de la réaction correspond aux normes du tableau IV.

3. Lecture

Après avoir, d'une chiquenaude, remis en suspension les hématies éventuellement sédimentées, les plaques sont inspectées en les posant sur un bistrot auxiliaire du modèle ci-joint (figure 11) portant des disques noirs imprimés. Selon qu'il y a ou pas hémolyse, on perçoit ou non le disque noir sous-jacent.

La lecture s'effectue selon la gamme habituelle des réactions de fixation du complément : de ++++ (fixation totale, pas d'hémolyse) à — (absence de fixation, hémolyse totale).

Le test sur plaque étant conçu pour un contrôle sérologique de troupeaux, on doit s'attendre à ce que l'immense majorité des sérums soit négative, c'est-à-dire que l'on verra partout les disques noirs du bistrot auxiliaire y compris, obligatoirement, celui situé en dessous de la cupule-témoin du complément. Un sérum positif ou douteux est immédiatement remarqué sur la plaque.

Les résultats sont notés sur le bistrot correspondant à la plaque, dans la case de chaque sérum.

Les sérums anticomplémentaires, c'est-à-dire ceux pour lesquels il n'y aura pas lyse des hématies dans la cupule de droite, sont mis de côté pour traitement ultérieur.

4. Interprétation

La réaction décrite ne diffère de celle de CAMPBELL et TURNER (4) que par l'examen de la seule dilution au 1/10 des sérums. Ce faisant, on pourrait a priori supposer, sur des bases théoriques, que certains sérums très fortement positifs fournissent un phénomène de zone et puissent apparaître négatifs à cette dilution. En 15 ans de pratique de la réaction de CAMPBELL et TURNER, l'auteur n'a jamais rencontré une telle éventualité; l'examen de la littérature prouve qu'il en est de même ailleurs. La pratique de l'utilisation de la seule

TABLEAU N°IV
Disposition de la réaction
(pour chaque sérum)

	Dilution	1/10	1/10
Sérum			
	Quantité	0,25	0,25
Antigène 5 U.A.		0,25	
Tampon			0,25
Complément 2,5 DMH		0,25	0,25
30 mn 37° C....		
Système hémolytique		0,25	0,25
30 mn 37° C....		

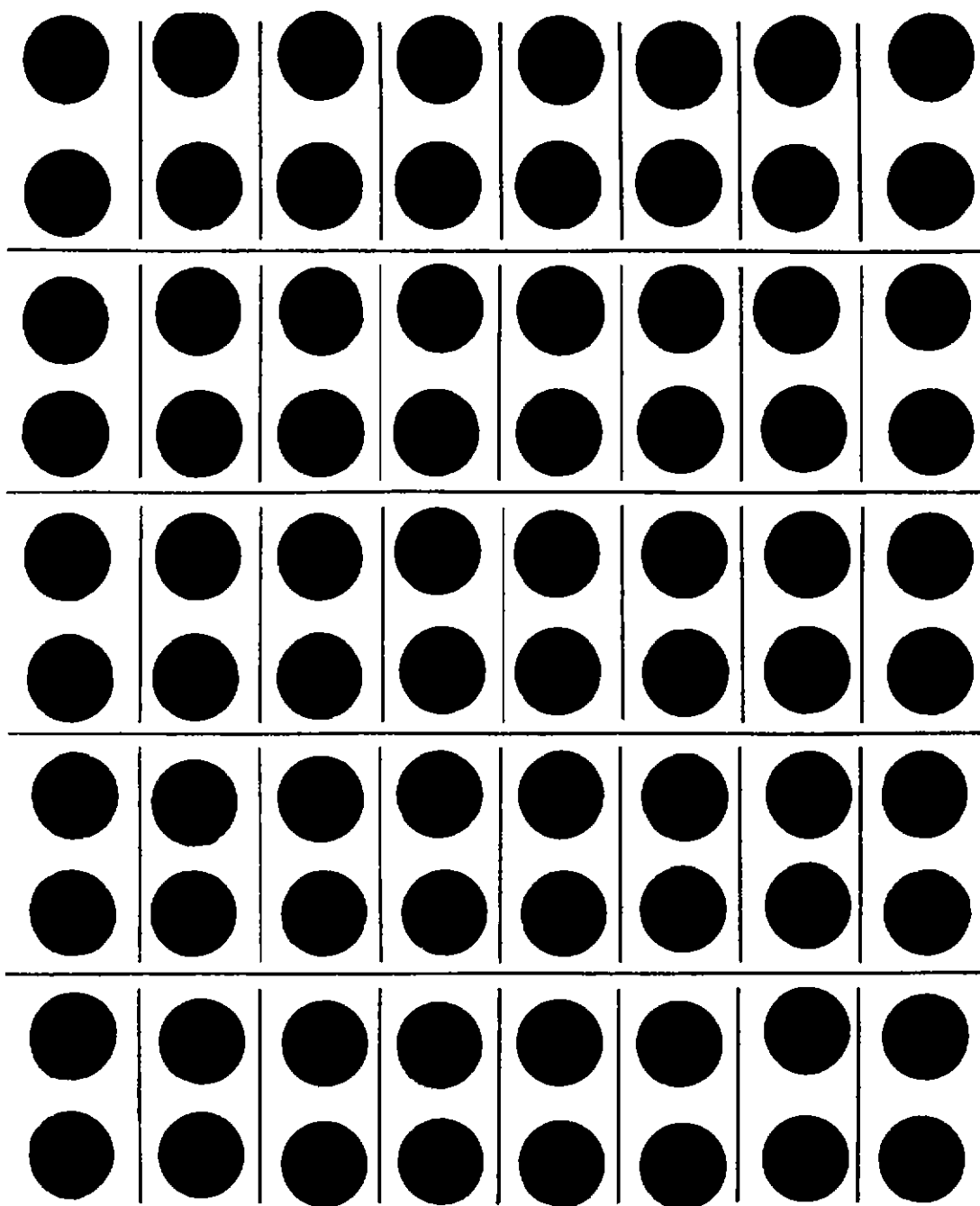


Fig. 11.

dilution au 1/10 paraît ainsi entièrement justifiée. C'est elle que HUDDART (11, 12) a utilisée dans l'est africain sur plusieurs centaines de milliers d'examen. Préconisé dès 1957 par GOLDING (8), l'examen de routine des sérums à cette seule dilution a été extensivement appliqué en Australie par TEAKLE (33) et PEARSON et McPHERSON (22).

Dans ces conditions, l'interprétation des résultats ne diffère pas de celle adoptée par les auteurs australiens (4, 8, 15). Toute réaction donnant une fixation à + + + +, + + + ou + + doit être considérée comme positive et entraîner l'élimination de l'animal en même temps que la mise en quarantaine du troupeau dont il provient. Ce point sera examiné plus loin.

Les sérums fournissant une fixation douteuse (+ ou quelques hématies non lysées) seront de nouveau examinés en fin de journée en même temps que les sérums anticomplémentaires.

5. *Traitement des sérums anticomplémentaires*

Les sérums anticomplémentaires sont traités dès qu'ils sont découverts par une technique dérivée de celle de LENNETTE et SCHMIDT (16) : adjonction de 1,05 ml de complément non dilué à 0,2 ml du sérum anticomplémentaire; séjour de quelques heures au frais; inactivation du complément résiduel par exposition à l'insolation directe ou, si le temps est couvert, par séjour dans un récipient d'eau portée à 60° C. On ajoute ensuite 0,37 ml de tampon qui fournit ainsi un sérum inactivé, dilué au 1/10. Le procédé a des analogies avec celui qu'a employé HUDDART (11) au Kenya.

Les sérums ainsi traités entrent directement en jeu dans un test complémentaire; ils sont introduits à la pipette dans les cupules. Les autres réactifs sont apportés au rhéomètre comme dans le test lui-même.

Les sérums douteux des tests précédents sont, eux aussi, repris et de nouveau examinés par le protocole décrit plus haut.

Certains sérums résistent au traitement d'abolition du pouvoir anticomplémentaire. D'après l'expérience de l'auteur, ces sérums proviennent de bovins péripneumoniques et doivent être considérés comme positifs; en effet, en poussant les dilutions, on fait disparaître

le pouvoir anticomplémentaire en même temps qu'apparaît la fixation spécifique.

OPERATIONS ULTERIEURES

1. *Tri des animaux à sérologie positive*

Les bovins ayant fourni une réponse positive sont retirés du troupeau. Leur devenir est fonction des circonstances locales d'application des règles de police sanitaire applicables à la péripneumonie. En les suivant de manière orthodoxe, ils devraient être abattus dans le délai le plus bref.

La mise en pratique de l'abattage, l'indemnisation éventuelle des propriétaires sont à décider par l'autorité vétérinaire nationale. On trouvera sous la plume de HUDDART (12) une excellente description du problème et des solutions proposées.

2. *Lavage du matériel*

Les plaques O.M.S. sont vidées de leur contenu puis lavées dans une solution faiblement détergente de « 7 X » dilué dans de l'eau froide, subissent 2 rinçages en eau ordinaire et un dernier en eau déionisée. Elles sont vigoureusement essorées pour chasser les ménisques d'eau résiduelle dans le fond des cupules et mises à sécher retournées, cupules en dessous.

Le reste du matériel est rincé à plusieurs reprises à l'eau puis à l'eau déionisée.

3. *Tenue des archives*

Le détail des opérations est reporté sur le cahier journalier en mentionnant les lots de réactifs, les dilutions utilisées... Les bristols ayant servi aux réactions sont conservés directement en archives, ce qui simplifie encore leur tenue.

CRITIQUE DE LA METHODE

Lors de la conception du test sur plaque, on a recherché la simplification des opérations à tous les stades, une standardisation poussée, l'augmentation de la vitesse d'exécution des tests, une interprétation des résultats ne pou-

vant donner lieu à appréciation individuelle ni à contestation.

Reprenant ce dernier argument qui possède toute sa valeur dans une campagne internationale contre la péripneumonie, il apparaît que ce n'est que la réaction de CAMPBELL et TURNER qui pouvait être utilisée. Les autres techniques de fixation du complément appliquées au diagnostic de la péripneumonie, ou bien n'ont pas fait l'accord unanime quant à l'interprétation des résultats, ou bien sont d'exécution trop délicate pour sortir du domaine du laboratoire. Ainsi en est-il de la réaction de LINDLEY (17), de Farcha (28), de PROVOST et QUEVAL (26) et, plus encore, celle de NEWING (21) qui réclame l'usage d'un photolorimètre.

Le test proposé a des analogies de conception avec la technique primitive de HUDDART (11) qui a eu son heure de gloire dans l'Est africain puis en Australie (19). Cette dernière n'a à son désavantage que d'être moins rapide que la technique que nous proposons, demandant un matériel plus fragile (centrifugeuse électrique, bain-marie) et d'être d'interprétation un peu plus délicate. Par contre, le nouveau test proposé par HUDDART (13), basé sur la capacité d'un sérum à fixer certaines quantités variables de complément, n'est pas entièrement standardisé quant à l'interprétation des résultats; les normes admises dans l'Est africain ne peuvent s'appliquer ailleurs ainsi que l'auteur a pu s'en rendre compte. De plus, relativement lente d'exécution, il paraît difficile de la recommander pour une campagne sérologique.

Au total, dans son essence même, le test proposé n'est qu'une adaptation sur plaque de la technique de CAMPBELL et TURNER (4). Mis à part des points de technologie (utilisation de plaques, dilution du sérum avec des anses, incubation sur plateau chauffant...), il ne se

départ de la technique australienne que par le procédé d'inactivation des sérums utilisant le phénol dilué au lieu de l'inactivation thermique. Le but recherché, et atteint, est le même, qui vise à se débarrasser du complément natif des sérums. La précaution prise de titrer le complément en présence de la même quantité d'acide phénique résiduelle que celle qui existera dans la réaction finale permet l'utilisation des mêmes paramètres de réactifs que dans la technique originale.

Il en résulte que les résultats fournis par le test sur plaque ne diffèrent absolument pas de ceux de la réaction de CAMPBELL et TURNER qui a fait l'unanimité des expérimentateurs (29) et se trouve être *la seule réaction de diagnostic de la péripneumonie à être incluse dans le Code Zoosanitaire de l'Office International des Epizooties*, après examen par la Commission pour l'étude des normes de produits biologiques approuvés par cette organisation (31). Il ne faut le prendre que comme une amélioration de la méthodologie d'exécution. Celle-ci est, au demeurant, sensible car une équipe de deux personnes peut traiter 1.000 sérums dans sa journée de travail, ne demandant à être aidée que pour la contention préalable à la prise de sang, ce qui peut être fait par les propriétaires eux-mêmes.

Le test sur plaque offre les mêmes garanties et souffre des mêmes critiques que la réaction australienne, garanties et critiques commentées par différents auteurs (29, 30, 8, 26).

En dernier ressort, on se souviendra qu'une technique sérologique met en évidence des anticorps sériques et que, ce faisant, elle est soumise aux aléas biologiques de leur apparition et de leur disparition mais aussi de leur spécificité. Vue sous cet angle, la réaction de CAMPBELL et TURNER est celle qui offre les meilleures garanties à l'heure actuelle.

SUMMARY

Immunological studies on contagious bovine pleuropneumonia. XIV. Description of two field techniques for the diagnosis of the disease.

In view of the setting-up of quick and specific diagnostic tests for the interafrican campaign against CBPP, the author makes proposals and describes in detail two techniques which can be easily performed in the field: one is a gel diffusion-precipitation micro-technique using a rehydratable agarose gel and dried, reagent-impregnated blotting-paper discs; the other is a plate adaptation of the classical Campbell and Turner test which

makes use of a robust, allground equipment and laboratory standardized reagents.

RESUMEN

Investigaciones inmunológicas sobre la peripneumonia. XIV. Descripción de dos técnicas aplicables sobre terreno para el diagnóstico de la enfermedad.

Teniendo por objeto la utilización de medios de diagnóstico rápidos y específicos para la campaña interafricana contra la peripneumonia, el autor propone y describe en detalle dos técnicas aplicables sin dificultades sobre terreno: la una es la precipitación-difusión en gelosa adaptada en micro-técnica, utilizando un agar-agar pudiendo rehidratarse y discos de papel secante impregnados con reactivos luego desecados; la otra es una adaptación sobre placas de plexiglas con cupulas de la reacción clásica de Campbell y Turner, utilizando un material robusto adaptado para el transporte todo terreno y reactivos unificados en el laboratorio.

BIBLIOGRAPHIE

- BORDET (R.), SEVESTRE (J.) et BOIVIN (R.). Prise de sang aux vaisseaux coccygiens chez les bovins. *Rec. Méd. vét.*, 1967, **143**: 945-951.
- BUKANTZ (S.), REIN (C.) et KENT (J.). Studies on complement fixation. II. Preservation of sheep's blood in citrate dextrose mixtures (modified Alsever's solution) for use in complement fixation reaction. *J. Lab. Clin. Med.*, 1946, **31**: 394.
- BYGRAVE (A. C.), MOULTON (J. E.) et SHIFFRINE (M.). Clinical, serological and pathological findings in an outbreak of contagious bovine pleuropneumonia. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1968, **16**: 21-46.
- CAMPBELL (A. D.) et TURNER (A. W.). Studies on contagious pleuropneumonia of cattle. IV. An improved complement fixation test. *Aust. vet. J.*, 1953, **29**: 154-163.
- CLARKE (D. H.) et CASALS (J.). Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropodborne viruses. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 1958, **7**: 561-573.
- DUBOIS (M. P.). Conservation d'hématies destinées aux réactions d'immunohémolyse. *Path.-Biol.*, 1969, **17**: 791-792.
- ETHERIDGE (J. R.) et LLOYD (L. C.). Increased sensitivity of the complement fixation test for contagious bovine pleuropneumonia on sera preserved with phenol. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1968, **16**: 295-301.
- GOLDING (N. K.). The application of the complement fixation test to the control of contagious pleuropneumonia of bovines. *Aust. vet. J.*, 1958, **34**: 361-369.
- GRASSET (N.). Gel diffusion micro-technique in virology. *Symp. Series Immunobiol. Standard.*, 1965, **4**: 281-294. Basel, Karger, 1967.
- GRIFFIN (R. M.). A gel diffusion precipitin test for contagious bovine pleuropneumonia. *J. comp. Path.*, 1965, **75**: 223-231.
- HUDDART (J.). A field modification of the complement fixation test for contagious bovine pleuropneumonia. F.A.O., Rome 1963. (Animal Health Branch Monograph n° 6.)
- HUDDART (J.). Field control of CBPP under East african conditions. In: HUDSON (J. R.), Contagious bovine pleuropneumonia. Rome, F.A.O., 1971. (F.A.O. Agricultural Studies n° 86.)
- HUDDART (J. E.). Contagious bovine pleuropneumonia. Manual of field control methods. Document F.A.O. non publié.
- KARST (O.). Contagious bovine pleuropneumonia: a plate complement fixation test employed at the Federal Department of Veterinary Research, Vom. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1970, **18**: 5-11.
- LADDS (P. W.). The value of complement fixation testing of slaughter cattle in surveying the incidence of bovine contagious pleuropneumonia. *Aust. vet. J.*, 1965, **41**: 387-390.
- LENNETTE (B. H.) et SCHMIDT (N. J.). Studies on the development and persistence of complement - fixing and neutralizing antibodies in human poliomyelitis. *Am. J. Hyg.*, 1957, **65**: 210-238.
- LINDLEY (E. P.) et PEDERSEN (V.). The agar gel double diffusion test in studies on contagious bovine pleuropneumonia. Document non publié du cours F.A.O. sur les mycoplasmes animaux, Khartoum, février 1967.
- LINDLEY (E. P.) et PEDERSEN (V.). An experiment on the survival of *M. mycoides* in the tissues of animals vaccinated with contagious bovine pleuropneumonia vaccine. *Sud. J. vet. Sci. Anim. Husb.*, 1968, **9**: 1-8.
- LLOYD (L. C.). Progress in the eradication of contagious bovine pleuropneumonia in Australia. *Aust. vet. J.*, 1969, **45**: 145-149.
- MACKELLAR (J. C.). Collection of blood sample and smears for diagnosis. *Vet. Rec.*, 1970, **86**: 302-306.
- NEWING (C. R.). A quantitative complement fixation test for use in laboratory investigations of bovine contagious pleuropneumonia. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1957, **5**: 149-159.
- PEARSON (C. W.) et McPHERSON (G.). A modified complement fixation test for contagious bovine pleuropneumonia. *Aust. vet. J.*, 1966, **42**: 324-327.
- PERREAU (P.), GAYT (P.) et MONNIER (J.). La méthode d'immunofluorescence et l'identification des mycoplasmes. Application au diagnostic de la péripneumonie. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1969, **22**: 481-493.
- PRIESTLEY (F. W.). The effect of phenol on the complement fixation test for Johne's disease. *Res. vet. Sci.*, 1960, **1**: 177-181.
- PROVOST (A.). Rapport de mission pour l'étude

- d'une campagne de lutte contre la péripneumonie bovine en Afrique centrale. Publication du Secrétariat d'Etat français aux Affaires Etrangères, Paris, juillet 1971.
26. PROVOST (A.) et QUEVAL (R.). Recherches immunologiques sur la péripneumonie. X. Proposition d'une nouvelle technique sérologique pour le diagnostic expérimental de la maladie : le test des quatre tubes. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1968, **21** : 317-334.
 27. PROVOST (A.), QUEVAL (R.), BORREDON (C.) et MAURICE (Y.). Recherches en vue d'une méthode rapide de diagnostic de la peste bovine. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1963, **16** : 287-297.
 28. QUEVAL (R.), PROVOST (A.) et VILLEMOT (J.M.). Comparaison de méthodes de déviation du complément utilisées dans l'étude de la péripneumonie bovine. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1964, **12** : 159-170.
 29. Rapport de la 3^e réunion du groupe FAO/OIE/OUA d'experts de la péripneumonie bovine. Rapport de réunion AN 1967/2. F.A.O., Rome, 1967.
 30. Rapport de la 4^e réunion du groupe FAO/OIE/OUA d'experts de la péripneumonie contagieuse bovine. Rapport de réunion AGA 1971/6. F.A.O., Rome, 1971.
 31. Résolutions de la 39^e session générale de l'Office International des Epizooties, Paris, 24-29 mai 1971.
 32. SHIFRINE (M.). A rapid gel diffusion precipitin test for contagious bovine pleuropneumonia. *Bull. Wildlife Dis. Ass.*, 1967, **3** : 36.
 33. TEAKLE (R. E.). A modified complement fixation test for bovine contagious pleuropneumonia for large-scale laboratory use. *Qd J. Agric. Sci.*, 1966, **23** : 609-616.
 34. TURNER (A. W.). Detection of *Mycoplasma mycoides* antigen and antibody by means of precipitin tests, as aids to diagnosis of bovine contagious pleuropneumonia. *Aust. vet. J.*, 1962, **38** : 335-337.
 35. WHITE (G.). Agar double diffusion precipitation reaction applied to the study of *Asterococcus mycoides*. *Nature*, 1958, **181** : 278-279.